

利用斑马鱼模型研究 琼胶寡糖抗氧化机制

邹娅雪^{1,*}, 付晓婷^{1,*}, 段德麟², 许加超¹, 高 昕¹, 王学良³

(1. 中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东青岛 266003;

2. 中国科学院海洋研究所, 山东青岛 266071;

3. 福建环海生物科技股份有限公司, 福建诏安 363502)

摘 要:为进一步实现琼胶寡糖的高值化利用,探究琼胶寡糖(Agaro-oligosaccharides, AOS)对2,2-偶氮二(2-甲基丙基咪)二盐酸盐(AAPH)诱导损伤后斑马鱼的抗氧化作用及机制。采用高效液相色谱法对酸法制备的琼胶寡糖组分进行分析。优化建立AAPH诱导的斑马鱼模型,并以斑马鱼胚胎存活率、活性氧生成率和细胞死亡率评价不同浓度琼胶寡糖的抗氧化活性。结果表明,琼胶寡糖主要由琼二糖(51.60%)、琼四糖(28.40%)和琼六糖(14.50%)组成,对斑马鱼胚胎添加琼胶寡糖浓度低于200 $\mu\text{g/mL}$ 时无致畸、致死毒性;琼胶寡糖(25、50、100 $\mu\text{g/mL}$)对最优AAPH诱导浓度(15 mmol/L)引起的氧化应激损伤斑马鱼模型有保护作用,且呈剂量依赖性。其中最优化浓度100 $\mu\text{g/mL}$ 琼胶寡糖能显著提高斑马鱼胚胎存活率(96.88%, $p < 0.05$),显著降低AAPH引起的斑马鱼体内活性氧生成率(100.53%, $p < 0.05$)和细胞死亡率(101.69%, $p < 0.05$)。本研究通过斑马鱼模型首次揭示了琼胶寡糖可通过清除体内大量活性氧生成和阻止细胞死亡损伤的抗氧化机制实现提高其体内抗氧化活性,为其作为保健功能食品等应用提供了理论基础。

关键词:琼胶寡糖, 抗氧化活性, 斑马鱼, 2,2-偶氮二(2-甲基丙基咪)二盐酸盐

Antioxidant Activities of Agaroligosaccharides in AAPH-induced Zebrafish Model

ZOU Ya-xue¹, FU Xiao-ting^{1,*}, DUAN De-lin², XU Jia-chao¹, GAO Xin¹, WANG Xue-liang³

(1. College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China;

3. Fujian Global Ocean Biotechnology Co., Ltd., Zhao'an 363502, China)

Abstract: In order to further realize the high value utilization of agaroligosaccharides (AOS), antioxidant activities and mechanisms of AOS, 2,2-azobis(2-methylpropylimidazole) dihydrochloride (AAPH)-induced zebrafish model were studied. The composition of AOS was determined by HPLC. The optimal AAPH induced zebrafish oxidative stress model was established, and the antioxidant activities of AOS with different concentrations were investigated by determination of embryo survival rate, reactive oxygen production rate, and cell death rate. The results showed that AOS was mainly composed of agarobiose (51.60%), agarotetraose (28.40%) and agarohexaose (14.50%). Zebrafish embryos with AOS concentration below 200 $\mu\text{g/mL}$ had no teratogenic and lethal toxicity. AOS (25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$) had a protective effect on oxidative stress induced by AAPH (15 mmol/L) in a dose-dependent manner. The optimal concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$ AOS could significantly increase the survival rate of zebrafish embryos (96.88%, $p < 0.05$), and could significantly reduce the reactive oxygen species production rate (100.53%, $p < 0.05$) and cell death rate (101.69%, $p < 0.05$) of AAPH-induced zebrafish. In this study, the zebrafish model was used to reveal for the first time. AOS had antioxidant activity *in vivo* by eliminating a large number of reactive oxygen species (ROS) production and preventing cell death and injury, which provided a theoretical basis for the application of AOS as a health food.

Key words: AOS; antioxidant activity; zebrafish; AAPH

中图分类号: TS254.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2019)04-0286-07

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2019.04.048

引文格式: 邹娅雪, 付晓婷, 段德麟, 等. 利用斑马鱼模型研究琼胶寡糖抗氧化机制[J]. 食品工业科技, 2019, 40(4): 286-291, 298.

收稿日期: 2018-07-03

作者简介: 邹娅雪(1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 水产品加工及贮藏工程, Email: 406799530@qq.com。

* 通讯作者: 付晓婷(1980-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 海藻精深加工, Email: xiaotingfu@ouc.edu.cn。

基金项目: 国家海洋局海洋公益项目(201405040); 科技部中韩国际合作项目(2015DFG32290)。

琼胶 (Agar) 作为海洋红藻植物细胞壁中的多糖成分, 多从石花菜属 (*Gelidium*) 或江蓠属 (*Gracilaria*) 藻类提取获得, 常作为食品添加剂、微生物培养基等广泛应用于食品工业和生物技术领域^[1-2]。琼胶虽无毒无害, 但其粘度高、溶解性差, 且作为生物大分子难以被人体吸收利用。这极大限制了其在医药、保健食品和化妆品中的高值化应用^[3]。通过酶法、酸法水解琼胶获得的琼胶寡糖, 分子量减小、水溶性好且易被人体吸收, 其生物活性和应用价值得到显著提高^[1]。

琼胶寡糖 (Agaro-oligosaccharide, AOS) 多为 1~10 个琼二糖重复结构单位连接形成的低聚糖, 根据碳链还原性末端结构差异可划分为琼寡糖 (3, 6-内醚- α -L-半乳糖残基) 和新琼寡糖 (β -D-半乳糖残基) 两大系列^[4]。作为新型的功能性海洋低聚糖, AOS 可由酸法或酶法制得, 且有多种生物活性, 包括抗氧化^[5]、抗炎^[6-7]、抗肿瘤^[8-9]、抗糖尿病^[10]和益生元^[4]等。Chen 等^[11-12]曾研究不同酸对琼胶的降解产物的影响, 结果表明盐酸在一定条件下可将琼胶降解为聚合度在 2~10 偶数琼寡糖, 且表现出一定的体外抗氧化活性。此外, 许多研究证实 AOS 具有体外抗氧化活性^[12-15], 单一聚合度 AOS 在鼠类哺乳动物中的抗氧化活性鲜有报道^[12-16], 未见多聚合度 AOS 混合物的体内抗氧化活性报道。

利用小鼠等哺乳动物模型研究天然物质的抗氧化活性已较为普遍, 但这一方法也存在成本高、周期长、操作复杂等问题。斑马鱼 (*Danio rerio*), 一种小型热带观赏鱼, 属鲤科淡水脊椎动物, 由于其体型小、养殖成本低、繁殖周期短、产卵数目多、胚胎发育透明可见等优势已成为国际标准化组织推荐的模式生物^[17]。此外, 斑马鱼全基因组测序结果表明了其人类基因组有 87% 的同源性, 使其成为研究人类疾病的模式动物^[18]。近年来, 斑马鱼作为模式动物广泛应用于毒理评价、药物筛选和生物活性评价等诸多领域^[17], 现已有利用斑马鱼模型评价海洋褐藻中多糖、多酚等物质生物活性^[19-20], 但未见利用斑马鱼模型研究海洋红藻 AOS 抗氧化活性的报道。

研究表明, 一定浓度的 2,2'-偶氮二(2-甲基丙基咪)二盐酸盐 (AAPH) 可刺激早期斑马鱼胚胎诱发其体内的氧化应激过程, 机体产生过量且无法清除的活性氧 (ROS), ROS 又可造成一系列细胞损伤, 引起细胞死亡^[21-23]。荧光探针染料 2,7-二氯二氢荧光素二乙酸酯 (DCFH-DA) 本身无荧光, 但可穿过生物体细胞膜进入其细胞内, 被胞内酯酶水解成不能透过细胞膜的 DCFH, 从而使探针装载到细胞内。细胞内活性氧在过氧化物酶存在下氧化无荧光的 DCFH 生成有荧光的二氯荧光素 (DCF)^[24], 因此, DCF 的荧光强度可显示机体细胞内活性氧相对水平。吖啶橙, 一种核酸特异性的异染染料, 通过嵌入或静电吸引与 DNA 和 RNA 相互作用, 可染色坏死或非常晚期的凋亡细胞^[22,25]。由于斑马鱼胚胎、幼鱼早期透明可见, 因此可通过荧光染料 DCFH-DA、吖啶橙等特异性的检测其体内活性氧生成率和细胞死亡率, 进一步说明其机体氧化应激水平。

本实验利用优化的斑马鱼氧化模型, 研究了不同浓度的 AOS 基本毒性和抗氧化活性, 为 AOS 在功能性食品和化妆品中的应用奠定了理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

成年野生 AB 系斑马鱼 中国海洋大学医药学院分子医学生物学实验室提供; 琼胶 (提取原料为江蓠属龙须菜) 福建环球海洋生物科技有限公司; AAPH、DCFH-DA、吖啶橙、三卡因 美国 sigma 公司; 氯化钠、氯化钾、氯化钙、硫酸镁、亚甲基蓝、盐酸 分析纯, 上海国药集团化学试剂有限公司; 琼二糖、琼四糖、琼六糖 日本 Takara Bio Inc 公司。

Agilent 1260 II 液相色谱仪 美国安捷伦公司; Thermo BioBasic SEC-120 色谱柱 (300 mm × 7.8 mm) 美国 Thermo 公司; SPX-100B-Z 型生化培养箱 上海博讯实业有限公司; SZ61 体式显微镜 日本奥林巴斯; DMI 6000B 倒置荧光显微镜 德国 Leica 公司; FA2004B 电子天平 上海天美天平仪器有限公司; Milli Q 纯水机 默克密理博实验室设备 (上海) 有限公司; FD5-2.5 冷冻干燥机 北京金西盟仪器有限公司; 斑马鱼全自动循环养殖系统 北京爱生科技发展有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 AOS 的制备 AOS 的制备方法参考陈海敏等^[26]的研究。将 5 g 琼胶粉末加入 100 mL 0.5 mol/L 的盐酸中搅拌均匀, 加热至 100 °C 条件下反应 3 h 后, 再加入 5 g 琼胶粉末继续在 100 °C 水解反应 3 h。反应结束后, 将水解产物冷却至室温后过滤、冻干 (温度: -55 °C; 时间: 48 h; 压强: <1.33 Pa)。

1.2.2 AOS 成分测定 称量 0.05 g 冻干粉末用 1 mL 去离子水溶解后, 用高效液相色谱法测定其比例和组成, 色谱柱为 Thermo BioBasic SEC-120 色谱柱, 检测器为示差检测仪检测, 流速为 0.5 mL/min, 流动相为 40% 甲醇。使用商品化的琼二糖、琼四糖和琼六糖 (均为 5 mg/mL) 作标准品对制备的 AOS 进行定性分析, 根据出峰时间和峰面积计算各聚合度 AOS 的组成比例。

1.2.3 斑马鱼喂养及胚胎收集 斑马鱼饲养于全自动循环系统中, 参照 Westerfield^[27]的方法养殖、培育, (26 ± 1) °C 水环境, 光周期为照明 14 h/黑暗 10 h 交替进行, 每日以一定量的丰年虾 (卤虫) 于早晚固定时间各饲喂一次。实验用胚胎由健康雌雄斑马鱼自然交配获得。收集 300~400 枚胚胎于干净培养皿中并移除排泄物、杂质及未受精胚胎, 加入胚胎培养液 (10% NaCl, 0.3% KCl, 0.3% CaCl₂, 0.79% MgSO₄, 0.1% 亚甲基蓝), 转移于 (28.5 ± 1) °C 恒温培养箱中培养 7~9 h。

1.2.4 胚胎给药 筛选受精且发育至 7~9 hpf (hours post fertilization, 受精小时) 同时期的斑马鱼胚胎, 移入 24 孔细胞培养板中, 每孔 15 枚胚胎, 除去残留培养液后, 根据实验设计, 每孔分别加入用胚胎培养液稀释的 AOS 活性物 (25、50、100、150、200、400 μg/mL) 或 AAPH 诱导物 (10、15、20、25、30 mmol/L), 纯胚胎培

养液作空白对照,每个浓度3个孔(平行)^[21]。活性物和诱导物给药后,将24孔板转移于 $(28.5 \pm 1)^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中继续培养待后续观察及检测。

1.2.5 AAPH 诱导斑马鱼氧化模型优化 根据文献[21-23],选择不同浓度(10、15、20、25、30 mmol/L) AAPH,进行单因素的氧化应激造模优化。8~9 hpf 给药,3 dpf 统计幼鱼存活率、正常发育率,并检测幼鱼体内活性氧生成率和细胞死亡率。

1.2.6 AOS 毒性评价 根据预实验结果,选择50、100、200、400 $\mu\text{g/mL}$ AOS 在7~8 hpf 给药,3 dpf 时期进行幼鱼存活率统计、幼鱼体内活性氧生成率和细胞死亡率的检测。

1.2.7 AOS 抗氧化活性评价 选择无过氧化毒性的 AOS 安全浓度于7~8 hpf 进行胚胎给药,在 $(28.5 \pm 1)^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中预孵育,1 hpf 后选用得到的最优 AAPH 诱导浓度进行氧化应激诱导,3 dpf 时期进行幼鱼存活率统计、幼鱼体内活性氧生成率和细胞死亡率检测。

1.2.8 指标测定

1.2.8.1 斑马鱼表型观察及存活率统计 每天于体式显微镜下观察胚胎发育状况,记录并及时移除死亡胚胎(死亡胚胎发白,死亡幼鱼无心跳,且尾部弯折),统计胚胎发育至3 dpf 时期各孔幼鱼存活率情况及发育状况(存活率=3 dpf 存活个数/总个数,正常发育个数=3 dpf 正常个数/总个数)。

1.2.8.2 体内活性氧生成率和细胞死亡率检测 3 dpf 时期,加入吖啶橙或 DCFH-DA 等荧光试剂,于 28°C 培养箱中避光孵育。后用三卡因麻醉剂麻醉幼鱼,于荧光显微镜下捕获荧光图片,并用 Image J 软件分析,统计相对荧光强度。体内细胞死亡率以吖啶橙染色后给药组荧光强度与空白组荧光强度之比进行统计,体内活性氧的产生以 DCFH-DA 染色给药组荧光强度与空白组荧光强度之比进行统计。

1.3 数据分析

所有的实验至少重复三次,结果以 $M \pm SD$ 表示,通过 one-way ANOVA 对实验结果进行统计学分析,运用多重比较 Turkey 检验分析实验数据间的差异性。所示结果中, $p < 0.05$ 判断为具有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 AOS 的组成

自制 AOS 的高效液相色谱见图1。结果表明,制备的 AOS 为不同聚合度琼寡糖混合物,主要是琼二糖、琼四糖和琼六糖,占比分别为 51.60%、28.40%、14.50%。课题组前期对琼二糖、琼四糖、琼六糖分离纯化后,分别测定了其细胞水平的抗氧化活性,结果表明,相同浓度下混合物的活性大于单一组分活性。因此,本论文以未经纯化的 AOS 混合样品作为研究对象,探究其在斑马鱼体内的抗氧化活性。

2.2 AAPH 诱导斑马鱼氧化模型优化

2.2.1 AAPH 诱导浓度对斑马鱼胚胎存活发育的影响 如图2A所示,各实验浓度下的 AAPH 均导致了

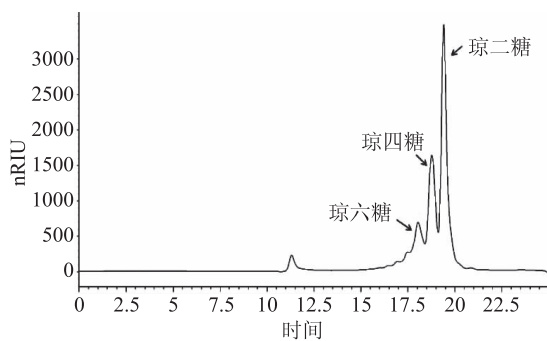


图1 自制 AOS 的液相色谱图

Fig.1 HPLC spectrogram of the prepared AOS

一定数量的胚胎死亡现象,且胚胎存活率与 AAPH 诱导浓度呈剂量依赖性下降,但存活率都在 50% 以上,未达到半数致死剂量,均可供进一步实验。但通过胚胎发育情况图 2B 结果表明,高浓度(25、30 mmol/L) AAPH 对斑马鱼胚胎发育造成严重损伤,正常发育率过低(40.77%、28.32%),且结合图 2C 可知,3 dpf 斑马鱼正常发育状态如图 2C(f) 所

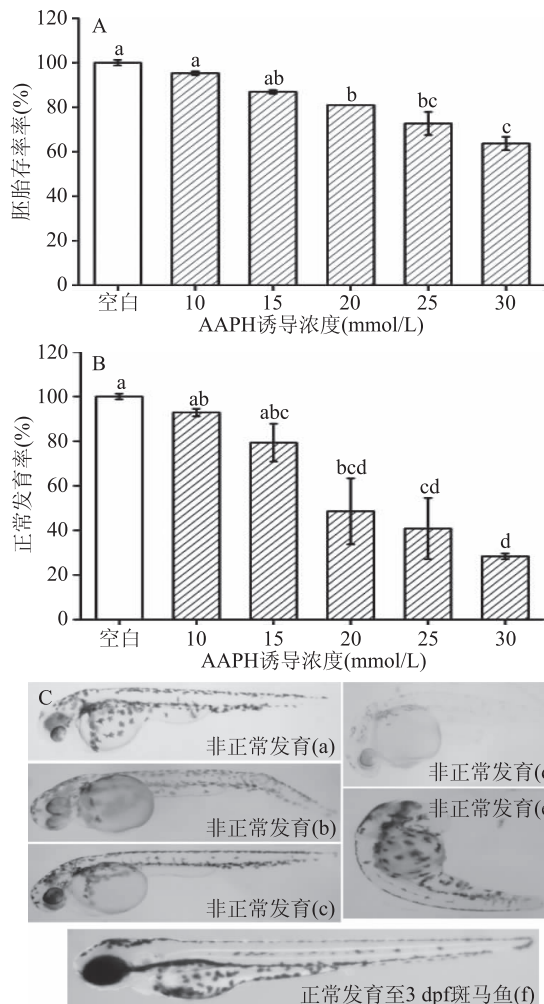


图2 AAPH 诱导浓度对斑马鱼胚胎存活发育的影响

Fig.2 Effect of AAPH-induced concentration on the survival and development of zebrafish embryo

注:柱形图上方不同字母代表差异性显著, $p < 0.05$,图4~图10同。

示,非正常发育状态则如图 2C(a)~图 2C(e)所示,表现出发育迟缓、着色浅、卵黄囊肿大、尾部弯折、畸形等形态,因此,较低的正常发育率不利于后续体内荧光指标检测,而低、中浓度(10、15、20 mmol/L) AAPH 对斑马鱼胚胎损伤较为适宜,均可满足后续检测。

2.2.2 AAPH 诱导浓度对斑马鱼幼鱼体内氧化应激水平的影响 斑马鱼幼鱼在低、中浓度 AAPH 诱导后的荧光检测结果如图 3 和图 4。结果表明,15 mmol/L AAPH 诱导斑马鱼胚胎可显著提高其幼鱼体内过氧化应激水平($p < 0.05$),与空白组相比,其活性氧产生率能达 109.37%,细胞死亡率可达 121.43%,高于 10、20 mmol/L AAPH 诱导引起的过氧化应激水平。因此,后续实验选择最优 15 mmol/L AAPH 诱导浓度进行造模诱导。此最优浓度与 Kim 等^[22]、Lee 等^[28]的 AAPH 诱导浓度相同,实验结果可取。

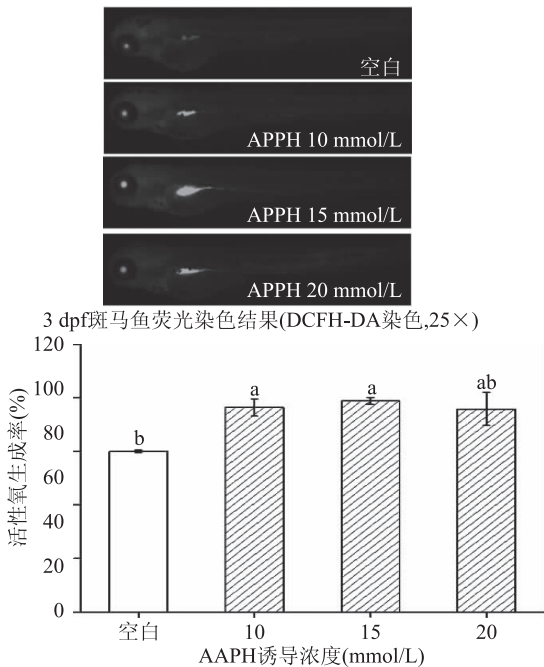


图3 AAPH 诱导浓度对斑马鱼体内活性氧生成率的影响
Fig.3 Effect of AAPH-induced concentration on the reactive oxygen species production rate *in vivo*

2.3 AOS 毒性评价

2.3.1 不同浓度 AOS 对斑马鱼胚胎存活发育的影响 选择较大浓度梯度(50、100、200、400 $\mu\text{g/mL}$) AOS 进行毒性评价的结果如图 5 所示。50、100、200 $\mu\text{g/mL}$ AOS 对斑马鱼胚胎均无致畸、致死毒性,而高浓度 400 $\mu\text{g/mL}$ AOS 对斑马鱼胚胎有较低的毒性,与空白对照组相比差异显著($p < 0.05$),其存活率降低至 93.33%。

2.3.2 不同浓度 AOS 对斑马鱼幼鱼体内氧化应激水平的影响 如图 6、图 7,与空白组以及低浓度 AOS 组($\leq 200 \mu\text{g/mL}$)相比,400 $\mu\text{g/mL}$ AOS 显著提高了斑马鱼幼鱼体内的细胞死亡率(113.94%)和活性氧自由基产率(123.09%, $p < 0.05$)。此外,200 $\mu\text{g/mL}$ AOS 对斑马鱼胚胎虽无致畸、致死作用(图 5),但与空白组相比(图 6),该浓度下斑马鱼幼鱼体内活性氧

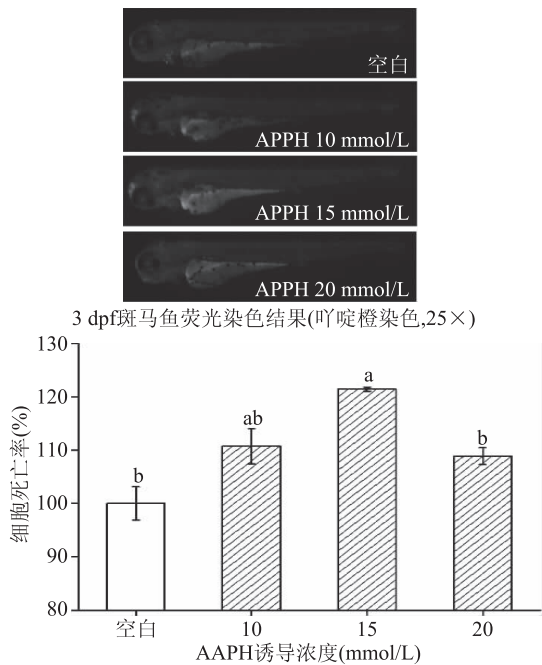


图4 AAPH 诱导浓度对斑马鱼体内细胞死亡率的影响
Fig.4 Effect of AAPH-induced concentration on the cell death rate *in vivo*

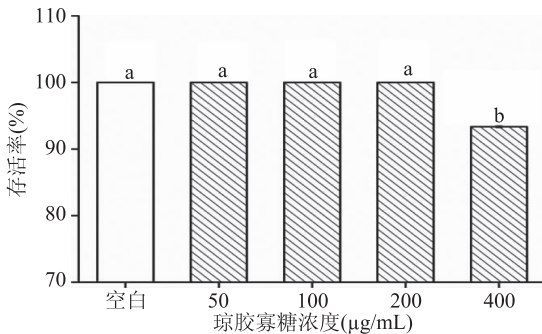


图5 AOS 浓度对斑马鱼胚胎的存活率的影响
Fig.5 Effect of AOS concentration on survival rate of zebrafish embryos

自由基水平表现出非显著性的升高(103.93%),表现出极弱的氧化刺激作用。因此可推测,低于 200 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的 AOS 对斑马鱼无胚胎损伤和氧化刺激,可作为活性评价的安全浓度。

Wijesinghe 等^[29]发现红藻江蓠属(*Laurencia snackeyi*)藻中活性物质 5-Hydroxypalisadin B 对斑马鱼幼鱼的氧化应激毒性,研究表明浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$ 时时可显著提高斑马鱼幼鱼体内的细胞死亡率,发生过氧化应激反应,而本实验中 400 $\mu\text{g/mL}$ AOS 才显著提高幼鱼体内的细胞死亡率($p < 0.05$),表明 AOS 的氧化应激毒性较弱,应用前景更广。

2.4 AOS 活性评价

2.4.1 不同浓度 AOS 对 AAPH 诱导的斑马鱼胚胎存活率的影响 由图 8 可知,与对照组相比,各浓度组 AOS 对 AAPH 诱导的斑马鱼氧化损伤均表现出显著保活作用($p < 0.05$),其中 25、50、100 $\mu\text{g/mL}$ AOS 预孵育后,斑马鱼存活率由 70% 剂量依赖性地分别提高至 80.00%、90.00%、96.88%。其最优 AOS 浓度为

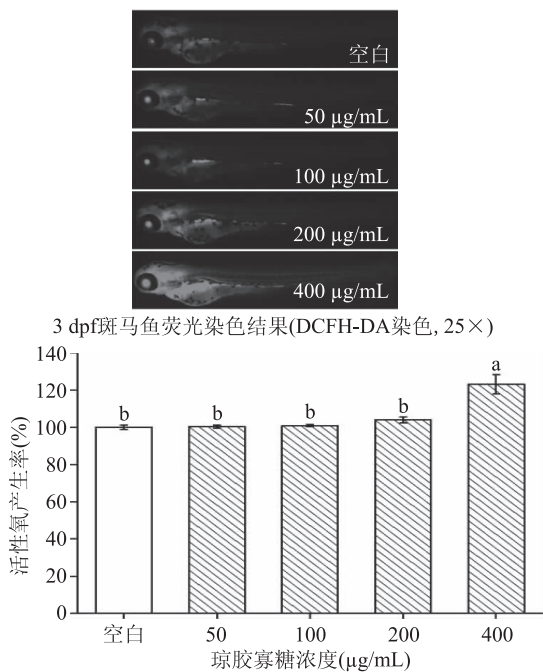


图6 AOS浓度对斑马鱼幼鱼体内活性氧生成率的影响
Fig.6 Effect of AOS concentration on the reactive oxygen species production rate *in vivo*

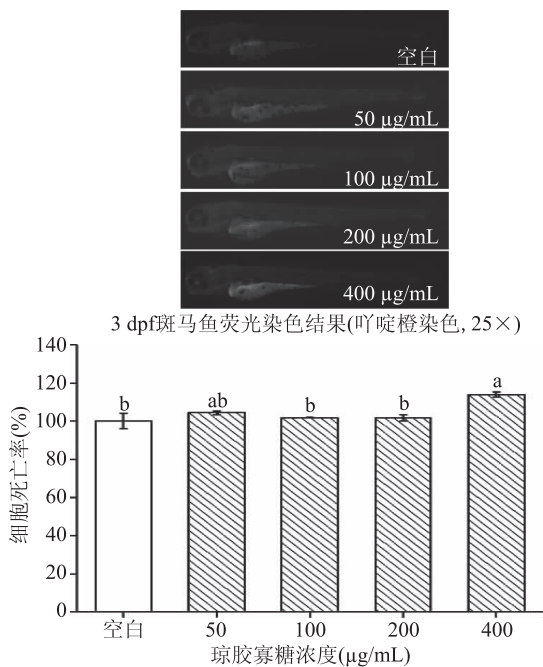


图7 AOS浓度对斑马鱼幼鱼体内细胞死亡率的影响
Fig.7 Effect of AOS concentration on the cell death rate *in vivo*

100 μg/mL,经该浓度 AOS 预孵育后,斑马鱼存活率与空白组无显著差异($p > 0.05$)。

2.4.2 不同浓度 AOS 对 AAPH 诱导的斑马鱼幼鱼体内氧化应激水平的影响 前期 15 mmol/L AAPH 给药刺激斑马鱼胚胎,使斑马鱼氧化损伤死亡率达 30%左右。由图 9 知,受 AAPH 诱导刺激存活的胚胎发育到 3 dpf 幼鱼出膜时期,其体内的活性氧自由基产生率较未受 AAPH 诱导的空白组而言显著升高(108.87%, $p < 0.05$);而预孵育 AOS (25、50、

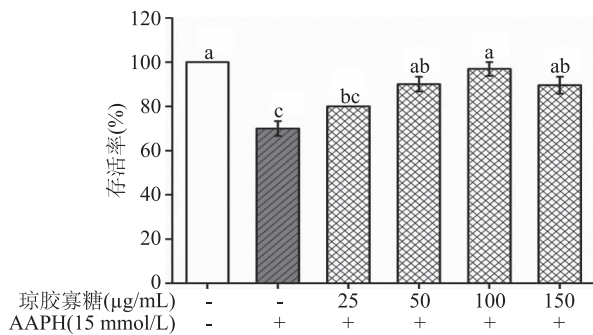


图8 AOS对AAPH诱导的斑马鱼胚胎的存活率的影响
Fig.8 Effect of AOS on survival rate of AAPH-induced zebrafish embryos

注: + 即前期给药;-即前期未给药,图 9~图 10 同。

100 μg/mL)后,其体内的活性氧自由基生成率剂量依赖性的下降(106.62%、102.81%、100.53%),且当 AOS 浓度为 100 μg/mL 时,其体内的活性氧自由基生成率同空白组无显著性差异(100.53%, $p > 0.05$)。预孵育 150 μg/mL AOS 时,不能降低 AAPH 诱导引起产生的过多活性氧,且此情况下斑马鱼幼鱼体内活性氧生成率为 109.28%,略高于仅 AAPH 诱导组,为 108.87%。由此可见,100 μg/mL AOS 为最优抗氧化浓度。

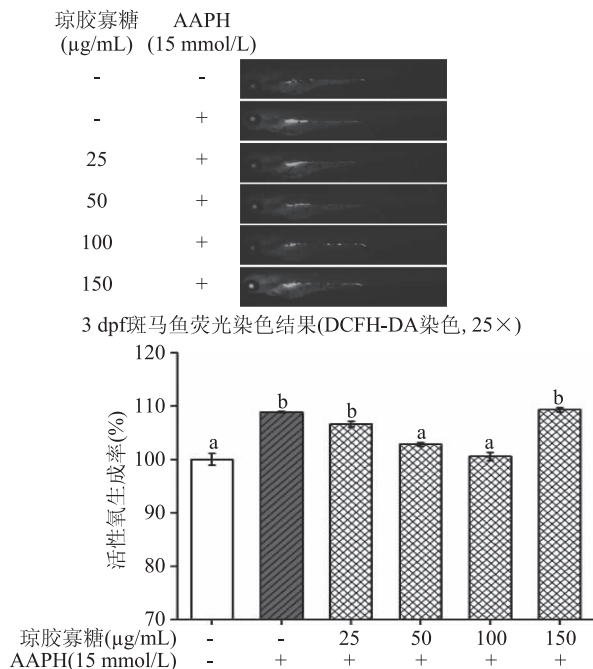


图9 AOS对AAPH诱导的斑马鱼幼鱼体内活性氧生成率的影响

Fig.9 Effect of AOS on the reactive oxygen species production rate of AAPH-induced zebrafish *in vivo*

斑马鱼 3 dpf 时期用吖啶橙对存活幼鱼进行细胞死亡特异性染色如图 10。与空白组相比,仅 AAPH 诱导组其细胞死亡率显著性升高(120.37%, $p < 0.05$),实验中预孵育各浓度 AOS (25、50、100、150 μg/mL)均降低了由 AAPH 氧化损伤引起的细胞死亡率。此外,用 25、50、100 μg/mL AOS 预孵育斑马鱼胚胎,能剂量依赖性地降低由 AAPH 引起的高细

胞死亡率,且预孵育浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 时斑马鱼幼鱼体内死亡率与空白组无显著性差异($p > 0.05$)。而预孵育 150 $\mu\text{g/mL}$ AOS 时,斑马鱼幼鱼体内细胞死亡率较 100 $\mu\text{g/mL}$ 浓度组(101.69%)非显著性的升高(107.94%)。此实验结果进一步表明 100 $\mu\text{g/mL}$ AOS 为最优抗氧化浓度。

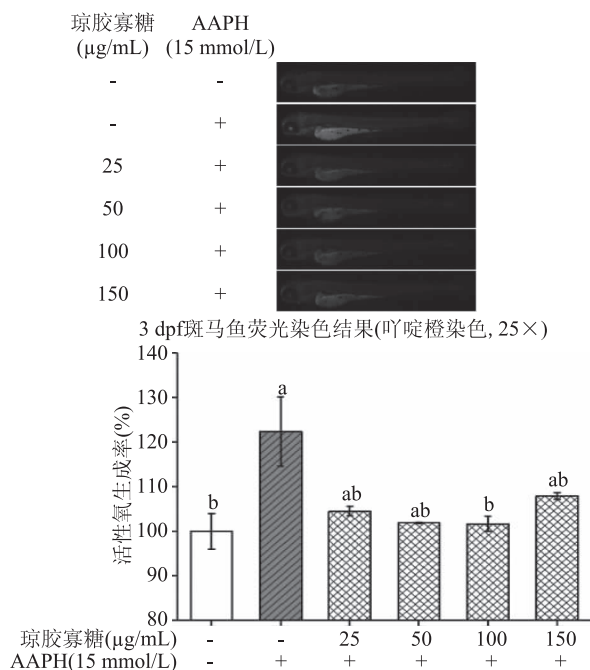


图10 AOS对AAPH诱导的斑马鱼幼鱼体内细胞死亡率的影响

Fig.10 Effect of AOS on cell death rate of AAPH-induced zebrafish *in vivo*

以上实验结果均表明了一定浓度的 AOS 具有良好的抗氧化活性,且其最优抗氧化浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$,这一结果优于 Kim 等^[23]利用同一模型研究的褐藻糖胶的最优抗氧化浓度(200 $\mu\text{g/mL}$)。由此可见,AOS 的抗氧化活性较高,具有极大的利用价值和市场前景。

3 结论与讨论

本研究优化了 AAPH 诱导斑马鱼氧化应激模型,并利用该模型首次评价了 AOS 的抗氧化活性。实验结果显示,在最优 AAPH 诱导浓度(15 mmol/L)下,斑马鱼幼鱼体内氧化应激达到最高水平,低于 200 $\mu\text{g/mL}$ 浓度琼胶寡糖对斑马鱼胚胎无明显氧化损伤。一定浓度琼胶寡糖(25、50、100 $\mu\text{g/mL}$)剂量依赖性的减小斑马鱼体内氧化应激水平,100 $\mu\text{g/mL}$ 琼胶寡糖不仅显著提高 AAPH 诱导引起的低存活率($p < 0.05$),而且显著降低 AAPH 诱导引起的斑马鱼幼鱼体内高活性氧生成率和细胞死亡率($p < 0.05$),且实验中使用的琼胶寡糖抗氧化效果优于已报道的褐藻糖胶^[23]。

已报道的 AOS 抗氧化作用机理有多种,宋香凝等^[5]的体外自由基清除实验已证明 AOS 对自由基清除能力强弱为:羟自由基的清除能力 > ABTS 自由基清除能力 > DPPH 自由基清除能力;Chen 等^[12,16]利用 H_2O_2 诱导损伤的人肝脏细胞氧化模型研究了不同聚合度 AOS 通过清除胞内活性氧自由基(ROS)表现出

不同的抗氧化活性;薛长湖等^[14]、陈海敏^[15]通过对肝损伤的鼠氧化模型灌胃 AOS 的研究表明,AOS 可以提高小鼠体内超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽酶(GSH)等抗氧化酶的活性清除多余自由基,最终达到抗氧化的目的。本研究结果则表明了 AOS 的又一抗氧化机理,即一定浓度 AOS(25、50、100 $\mu\text{g/mL}$)可通过直接清除 AAPH 诱导的斑马鱼幼鱼体内 ROS,和减少细胞死亡率实现其抗氧化活性,不仅佐证了 AOS 的潜在抗氧化活性,而且为 AOS 作为天然抗氧化资源的开发利用提供了又一理论依据。而琼二糖、琼四糖和琼六糖的混合物,其混合协同作用及在机体内的作用机制还需进一步研究。

参考文献

- [1] 欧阳茜茜,陈法锦,李思东,等.琼胶及琼胶寡糖的加工与应用研究进展[J].山东化工,2016,45(23):58-60.
- [2] 胡斌.新琼寡糖的益生元效应研究[D].青岛:中国海洋大学,2006.
- [3] 张伟宾,刘丹,许竞男,等.琼胶寡糖鉴定方法的研究进展[J].中国海洋药物,2017(6):96-102.
- [4] 郭晓凤.新琼寡糖的益生元作用研究[D].青岛:中国海洋大学,2014.
- [5] 宋香凝,郑毅,姜泽东,等.江蓠琼胶寡糖抗氧化性及对罗非鱼肉的保鲜作用[J].食品科技,2017(2):149-154.
- [6] Wang W, Liu P, Hao C, et al. Neogaro - oligosaccharide monomers inhibit inflammation in LPS - stimulated macrophages through suppression of MAPK and NF- κ B pathways[J].Scientific Reports,2017,7(44252):1-11.
- [7] Higashimura Y, Naito Y, Takagi T, et al. Oligosaccharides from agar inhibit murine intestinal inflammation through the induction of heme oxygenase-1 expression[J].Journal of Gastroenterology, 2013,48(8):897-909.
- [8] Enoki T, Tominaga T, Takashima F, et al. Anti - tumor - promoting activities of agaro - oligosaccharides on two - stage mouse skin carcinogenesis[J].Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2012,35(7):1145-1149.
- [9] Higashimura Y, Naito Y, Takagi T, et al. Protective effect of agaro - oligosaccharides on gut dysbiosis and colon tumorigenesis in high - fat diet - fed mice[J].American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology,2016,310(6):367-375.
- [10] Sun J H, Lee J H, Kim E J, et al. Anti - obesity and anti - diabetic effect of neogaro oligosaccharides on high - fat diet - induced obesity in mice[J].Marine Drugs,2017,15(4):1-12.
- [11] Chen H M, Zheng L, Lin W, et al. Product monitoring and quantitation of oligosaccharides composition in agar hydrolysates by precolumn labeling HPLC [J]. Talanta, 2004, 64 (3): 773-777.
- [12] Chen H M, Yan X J. Antioxidant activities of agaro - oligosaccharides with different degrees of polymerization in cell - based system[J].Biochimica Et Biophysica Acta,2005,1722(1): 103-111.
- [13] 徐强,薛长湖,赵雪,等.酸解法制备琼胶低聚糖及其抗

(下转第 298 页)

Bacteriophages for Food and Beverage Biopreservation, 2011 (13):324-347.

[63] Alzamora S, Weltri-chanes J, Guerrero S, et al. Rational use of novel technologies: A comparative analysis of the performance of several new food preservation technologies for microbial inactivation [M]. Springer: Novel Technologies in Food Science, 2012.

[64] Calo - Mata P, Arlindo S, Boehme K, et al. Current applications and future trends of lactic acid bacteria and their bacteriocins for the biopreservation of aquatic food products [J]. Food and Bioprocess Technology, 2008, 1(1):43-63.

[65] Cortesi L, Panebianco A, Giuffrida A, et al. Innovations in seafood preservation and storage [J]. Veterinary Research Communications, 2009, 33(1):15-23.

[66] Ghanbari M, Jami M. Lactic acid bacteria and their bacteriocins: A promising approach to seafood biopreservation [M]. Croatia: Lactic Acid Bacteria - R and D for Food, Health and Livestock Purposes, 2013:381-404.

[67] Sudalayandi M. Efficacy of lactic acid bacteria in the reduction of trimethylamine - nitrogen and related spoilage derivatives of fresh Indian mackerel fish chunks [J]. African

Journal of Biotechnology, 2011, 10(1):42-47.

[68] Kalschne L, Geitenes S, Veit R, et al. Growth inhibition of lactic acid bacteria in ham by nisin: A model approach [J]. Meat Science, 2014, 98(4):744-752.

[69] Katikou P, Ambrosiadis I, Georgantelis D, et al. Effect of *Lactobacillus* cultures on microbiological, chemical and odour changes during storage of rainbow trout fillets [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2007, 87(3):477-484.

[70] Hwanhlem N, Jaffre's E, Dousset X, et al. Application of a nisin Z - producing *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* KT2W2L isolated from brackish water for biopreservation in cooked, peeled and ionized tropical shrimps during storage at 8 °C under modified atmosphere packaging [J]. European Food Research and Technology, 2015, 240(6):1259-1269.

[71] Kuley E, Ozogul F, Balıkcı E, et al. The influences of fish infusion broth on the biogenic amines formation by lactic acid bacteria [J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2013, 44(2):407-415.

[72] Cotter P, Ross R, Hill C. Bacteriocin - a viable alternative to antibiotics [J]. Nature Review Microbiology, 2013, 11(2):95-105.

(上接第 291 页)

氧化性评价 [J]. 中国海洋药物, 2002, 21(1):19-22.

[14] 薛长湖, 徐强, 赵雪, 等. 琼胶低聚糖清除自由基的活性 [J]. 水产学报, 2003, 27(3):283-288.

[15] 陈海敏. 琼二糖寡聚体特效降解、标记分析、结构特征与生物活性的研究 [D]. 青岛: 中国科学院研究生院, 2004.

[16] Chen Haimin, Yan Xiaojun, Zhu Peng, et al. Antioxidant activity and hepatoprotective potential of agaro - oligosaccharides *in vitro*, and *in vivo* [J]. Nutrition Journal, 2006, 5(1):31-31.

[17] Caro M, Iturria I, Martinez - Santos M, et al. Zebrafish dives into food research: Effectiveness assessment of bioactive compounds [J]. Food and Function, 2016, 7(6):2615-2623.

[18] 许冰洁, 张立将, 李春启, 等. 斑马鱼胚胎评价 5 种药物的发育毒性与模型验证 [J]. 中国药理学通报, 2016(1):74-79.

[19] Lee S H, Ko C I, Jee Y, et al. Anti - inflammatory effect of fucoidan extracted from *Ecklonia cava* in zebrafish model [J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 92(1):84-89.

[20] Kang M C, Kim K N, Kang S M, et al. Protective effect of dieckol isolated from *Ecklonia cava* against ethanol caused damage *in vitro* and in zebrafish model [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2013, 36(3):1217-1226.

[21] Kang M C, Cha S H, Wijesinghe W A, et al. Protective effect of marine algae phlorotannins against AAPH - induced oxidative stress in zebrafish embryo [J]. Food Chemistry, 2013, 138(2-3):950-955.

[22] Kim E A, Lee S H, Ko C I, et al. Protective effect of fucoidan against AAPH - induced oxidative stress in zebrafish model [J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 102(1):185-191.

[23] Kang M C, Kim S Y, Kim Y T, et al. *In vitro* and *in vivo* antioxidant activities of polysaccharide purified from *Aloe vera* (*Aloe barbadensis*) gel [J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 99(1):365-371.

[24] Rosenkranz A R, Schmaldienst S, Stuhlmeier K M, et al. A microplate assay for the detection of oxidative products using 2', 7' - dichlorofluorescein - diacetate [J]. Journal of Immunological Methods, 1992, 156(1):39-45.

[25] Hu Y R, Ma H, Zou Z Y, et al. Activation of Akt and JNK/ Nrf2/NQO1 pathway contributes to the protective effect of coptisine against AAPH - induced oxidative stress [J]. Biomedicine and Pharmacotherapy, 2017, 85:313-322.

[26] 陈海敏, 严小军, 郑立, 等. 琼胶的降解及其产物的分析 [J]. 河南工业大学学报: 自然科学版, 2003, 24(3):41-44.

[27] Westerfield M. The zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*) [M]. Eugene: Univ of Oregon Press, 2007:6-13.

[28] Lee J H, Han J W, Ko J Y, et al. Protective effect of a freshwater alga, *Spirogyra* sp. against lipid peroxidation *in vivo* zebrafish and purification of antioxidative compounds using preparative centrifugal partition chromatography [J]. Journal of Applied Phycology, 2015, 28(1):1-9.

[29] Wijesinghe W A J P, Kim E A, Kang M C, et al. Assessment of anti - inflammatory effect of 5 β - hydroxypalisadin B isolated from red seaweed *Laurencia snackeyi*, in zebrafish embryo *in vivo* model [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2014, 37(1):110-117.